

Local anesthetic interactions with G protein-coupled receptor signaling

Citation for published version (APA):

Hollmann, M. W. (2001). *Local anesthetic interactions with G protein-coupled receptor signaling*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Shaker. <https://doi.org/10.26481/dis.20020301mh>

Document status and date:

Published: 01/01/2001

DOI:

[10.26481/dis.20020301mh](https://doi.org/10.26481/dis.20020301mh)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary and conclusions / Samenvatting en conclusies

Markus W. Hollmann

Summary and conclusions / Samenvatting en conclusies

This thesis reports the interaction of local anesthetics with various signaling pathways of G protein-coupled receptors. Although local anesthetics interact primarily with the sodium channel, from which interaction derive their analgesic and antiarrhythmic effects, not all actions of these compounds can be explained by sodium channel blockade. Their interaction with GPCR signaling pathways may explain some of the "alternative" effects of local anesthetics, (e.g. antithrombotic and antiinflammatory properties).

As reviewed in chapter 2, recent experimental results have modified profoundly our understanding of G protein-mediated transmembrane signaling. The concept of linear signal transduction pathways, i.e. one receptor coupling to one G protein that activates one effector, is inadequate to explain recent findings. The majority of seven transmembrane spanning receptors interact with diverse G proteins and elicit multiple intracellular signals. Interaction of a single G protein with a given receptor in a certain cell, however, may be regulated by a high degree of selectivity. G protein-mediated signal transduction can be seen as a complex, highly organized signaling network with diverging and converging transduction steps at the ligand-receptor, receptor-G protein, and G protein-effector composition. Although the α -subunit gained most attention for its important role in interactions with receptor and effector structures, and G proteins are named according to their α subunit, our knowledge of $G\beta\gamma$'s role in signal transduction has advanced from the assumption that it simply anchored and regulated $G\alpha$ to the demonstration that the β -isoform in the $\beta\gamma$ dimer also can determine the specificity of signaling at both effectors and receptors.

Chapter 3 has discussed several aspects of local anesthetic action that are considered independent of Na channel blockade. Local anesthetics provide a modest degree of general anesthetic action, and as such can be usefully employed to 'stretch' an anesthetic (e.g. at the end of a case). They also provide a considerable amount of neuroprotection. In combination with the hemodynamic stability provided, they are therefore of great usefulness in the practice of neuroanesthesia. The ability to reduce bronchial reactivity is well recognized, even if the underlying mechanism is poorly understood. Finally, these versatile compounds have been employed with success in a variety of other clinical settings, including tinnitus, pruritus and migraine.

Chapters 4 and 5 described local anesthetic inhibition of muscarinic m1 and m3 acetylcholine receptors expressed recombinantly in *Xenopus* oocytes. Their action on these signaling pathways might explain at least in part some of the additional effects of local anesthetics reported in chapter 3.

As detailed in chapter 4, we found that local anesthetics inhibit muscarinic m1 receptors expressed recombinantly in *Xenopus* oocytes. Lidocaine inhibits at concentrations significantly less than those required for blocking sodium channels. We suggest that this inhibitory effect is due to superadditive interactions between an extracellular, polar, non-competitive site on the muscarinic receptor molecule, and an intracellular site probably on the coupled G protein. Whereas the intracellular site appears to be the same on muscarinic, lysophosphatidate and thromboxane A_2 receptors, the lipid mediator receptors lack the extracellular polar local anesthetic binding domain.

Chapter 5 reports our finding that lidocaine reversibly inhibits signaling of m3 receptors recombinantly expressed in *Xenopus* oocytes. The calculated IC_{50} (370 nM) is significantly less than that required for blocking sodium channels. However, compared with inhibition of m1 muscarinic signaling (IC_{50} 18 nM), m3 signaling is approximately 21-fold less sensitive to lidocaine. This discrepancy is explained most parsimoniously by absence on the m3 receptor of the major extracellular binding site for charged local anesthetics that is present on the m1 receptor. The N-terminus and third extracellular loop of the m1 receptor molecule were identified as requirements for this extracellular binding site for charged local anesthetics. In contrast, intracellular inhibition of both receptors was quite similar. As determined for m1 signaling, m3 signaling is primarily mediated by G_q and G_{11} ; of these, G_q was shown to be a likely target for intracellular inhibition by local anesthetics. In summary, this study adds to previous findings that local anesthetics at clinically relevant concentrations can inhibit G protein-coupled receptors. The interactions between the

anesthetics and the receptor pathways are complex, and involve multiple sites of action, on receptor as well as coupled G protein. In view of the important roles of m1 and m3 muscarinic signaling in the brain and peripheral tissues, local anesthetic inhibition of these receptors is likely to be of relevance. The clinical implications remain to be addressed.

To elucidate in more detail a common intracellular site of action for local anesthetics within the signaling pathway of various G protein-coupled receptors, we determined the G protein- α -subunits coupling to those receptors using antisense methodology. As described in chapter 6, LPA signaling was shown to be inhibited by ropivacaine stereoisomers in a concentration-dependent and stereoselective manner, strongly suggesting a protein site of action for ropivacaine. This inhibition was primarily due to a non-competitive antagonism. We also found that LPA signaling is mediated primarily by $G\alpha_q$ and $G\alpha_o$. $G\alpha_q$ couples to both LPA, muscarinic m1, and trypsin receptors, and is a main target for intracellular LA inhibition of G protein-coupled receptors.

In conclusion, our studies suggest that G protein-coupled receptors may be common targets for local anesthetics. The concentrations used in these investigations are routinely attained after local injection of these compounds. Inhibition of G protein-coupled receptors by LA results in part from an intracellular action, which can be largely explained by selective interference with $G\alpha_q$ protein function.

Chapter 7 reviewed the effects of local anesthetics on inflammation, coagulation and wound healing. In this chapter we have summarized several interesting and potentially important "alternative" effects of LA, not explained by their well-known antinociceptive and antiarrhythmic actions. The most remarkable observation is that LA are able to prevent pathological changes such as hypercoagulability or excessive stimulation of the inflammatory system, without inducing increased bleeding or impairment of host defense. This sets them apart from drugs currently in use for treatment of such disorders, and points the way to potential therapeutic application. Indeed, we use intravenous LA infusions in patients who would benefit from epidural anesthesia/analgesia but are not candidates for the technique. We hope that this chapter will urge some readers to investigate these effects in more detail, because much more research is needed on basic mechanisms. What does seem clear is that Na^+ channel blockade plays only a limited, if any, role in these effects. Further research should determine which molecular determinants of the LA structure exert these effects and where the corresponding site of action is. This might eventually lead to development of new drugs, selective for treatment of these disorders, but without the "side effect" of Na^+ channel blockade.

Chapter 8 provides new insights into the mechanism of hPMN priming, and in addition suggest a mechanism by which LA may exert some of their anti-inflammatory actions. We have shown that platelet-activating factor (PAF) primes neutrophils through a pathway dependent on PTX-insensitive G proteins, PLC and PKC. PKC activation is both necessary and sufficient for this process. In addition, we show that clinically relevant concentrations of local anesthetics selectively inhibit priming, but not fMLP-induced activation. Ester-LA exerted the most profound inhibitory effect, whereas inhibitory potency of amide-LA increased with increased unchanged fraction. The main target site for LA in the PAF priming pathway is located upstream of PKC.

Finally we studied the preventive effects of epidural anesthesia on hypercoagulation in patients undergoing major orthopedic surgery, as reported in chapter 9. The major findings of this study were twofold. First, the hypercoagulable state induced by major orthopedic surgery, which is not easily demonstrated by routine coagulation tests, is reliably identified by the CSA parameters PHT and CT. The third parameter, CITF, showed a tendency towards shortening; however, this effect was not significant. Second, this hypercoagulability is completely prevented in patients receiving epidural anesthesia. We found no significant differences between knee and hip surgery. In summary, major orthopedic surgery induces a notable hypercoagulability, which is reliably determined by CSA, and prevented by epidural anesthesia.

Further investigations should focus on several issues. First, selective interaction of LAs with $G\alpha_q$ -function has to be confirmed in other models and the mechanism of action needs to be defined. Second, the active part of the LA molecule responsible for this selective interaction with G protein

function should be determined. Such studies will allow development of drugs based on LAs and possessing the beneficial effects noted, but lacking the "side effect" of Na channel blockade. Third, the non-Na channel effects of LAs *in vivo* should be defined in more detail, and their potential roles in modulating pathophysiologic roles should be investigated.

Samenvatting en conclusies

Dit proefschrift beschrijft de interacties van lokaal anesthetica met verschillende signaalcascades van G-eiwit-gekoppelde receptoren. Hoewel het natriumkanal het voornaamste aangrijpingspunt voor lokaal anesthetica is en de plaats waar hun analgetisch en anti-arrhythmisch effect tot stand komt, kunnen niet alle effecten van deze stoffen verklaard worden door natriumkanal blokkade. Hun interacties met GPCR signaalcascades kan sommige "alternatieve" effecten van lokaal anesthetica (b.v. antithrombotische en anti-inflammatoire effecten) verklaren.

Zoals beschreven in Hoofdstuk 2 hebben recente onderzoeken ons inzicht in G-eiwit-gemedieerde transmembraan signaalsvorming in grote mate verdiept. Het concept van een lineaire signaaltransductie (d.w.z. één receptor koppelend met één G-eiwit dat één effector activeert) is onvoldoende om de nieuwere bevindingen te verklaren. Het merendeel van de *seven-transmembrane* receptoren heeft interacties met verschillende G-eiwitten en genereert meerdere intracellulaire signalen. Interactie van een enkele receptor met een gegeven G-eiwit in een bepaalde cel kan echter met een hoge mate van selectiviteit worden gereguleerd. G-eiwit-gemedieerde signaaltransductie kan gezien worden als een complex, zeer georganiseerd signaal netwerk met divergerende en convergerende transductie stappen bij ligand-receptor, receptor-G-eiwit, en G-eiwit-receptor interacties. Hoewel de α -subeenheid de meeste aandacht heeft gekregen vanwege de belangrijke rol in interacties met receptor en effector structuren, en G-eiwitten naar hun α -subeenheid benoemd worden, is onze kennis van de rol van $G_{\beta\gamma}$ aanmerkelijk verbeterd, van de aanname dat het eenvoudigweg G_{α} verankerde en reguleerde, tot het aantonen dat de β isoform in de $\beta\gamma$ dimeer de specificiteit van signaaloverdracht aan zowel effectors als receptoren kan bepalen.

Hoofdstuk 3 behandelde enkele aspecten van de werking van lokaal anesthetica die als onafhankelijk van natriumkanal blokkade worden beschouwd. Lokaal anesthetica veroorzaken een beperkte mate van algehele anesthesie, en kunnen zodoende nuttig gebruikt worden om een anesthesie te "rekken" (b.v. aan het einde van een ingreep). Ze bieden ook een merkbare mate van neuroprotectie. In combinatie met de hemodynamische stabiliteit die ze verschaffen, zijn ze derhalve van groot nut voor de neuroanesthesie. Hun vermogen om bronchiale reactiviteit te verminderen is erkend, al zijn de onderliggende mechanismen slecht begrepen. Tenslotte zijn deze middelen met succes gebruikt in verschillende andere klinische situaties, waaronder tinnitus, jeuk en migraine.

De Hoofdstukken 4 en 5 beschrijven de inhibitie door lokaal anesthetica van m1 en m3 muscarinische acetylcholine receptoren na recombinante expressie in *Xenopus* oocyten. Hun effect op deze signaalcascades kan enkele van de effecten van lokaal anesthetica vermeld in Hoofdstuk 3 helpen verklaren. Als beschreven in Hoofdstuk 4, vonden we dat lokaal anesthetica m1 muscarinische receptoren na recombinante expressie in *Xenopus* oocyten inhiberen. Lidocaine remde in concentraties aanmerkelijk minder dan die benodigd om natriumkanalen te blokkeren. Dit remmende effect is waarschijnlijk een gevolg van superadditieve interacties tussen een extracellulaire, polaire, niet-competitieve bindingsplaats op het muscarinische receptormolecuul, en een intracellulaire bindingsplaats, waarschijnlijk op het gekoppelde G-eiwit. Terwijl de intracellulaire site dezelfde lijkt te zijn op muscarinische, lysophosphatidaat en thromboxaan A_2 receptoren, ontbreekt bij de lipidemediatoren het extracellulair polair lokaal anesthetica bindingsdomein. Hoofdstuk 5 beschrijft onze bevindingen dat lidocaine reversibel signaalsvorming van m3 receptoren na recombinante expressie in *Xenopus* oocyten remt. De berekende IC_{50} (370 nM) is aanmerkelijk minder dan die benodigd voor het blokkeren van natriumkanalen. Echter, vergeleken met de remming van m1 muscarinische signaalsvorming (IC_{50} 18 nM) is m3

signalvorming ongeveer 21 maal minder gevoelig voor lidocaine. Dit verschil is het meest eenvoudig verklaard door de afwezigheid van de belangrijke extracellulaire bindingsplaats voor geladen lokaal anesthetica die aanwezig is op de m1 receptor. De N-terminus en de derde extracellulaire bocht van het m1 receptor molecule werden geïdentificeerd als benodigd voor deze extracellulaire bindingsplaats voor geladen lokaal anesthetica. In tegenstelling, intracellulaire inhibitie van beide receptoren was zeer vergelijkbaar. Evenals m1 signalvorming vindt m3 signalvorming voornamelijk via G_q en G_{11} plaats; van G_q werd aangetoond dat het een waarschijnlijk aangrijpingspunt voor intracellulaire inhibitie door lokaalanesthetica is. Samenvattend ondersteunen deze studies eerdere bevindingen dat lokaal anesthetica in klinisch relevante concentraties G-eiwit gekoppelde receptoren kunnen remmen. De interacties tussen de anesthetica en receptorpaden zijn complex en omvatten meerdere aangrijpingspunten op zowel receptor als op het gekoppelde G-eiwit. Gezien de belangrijke rol van m1 en m3 muscarinische signalvorming in hersenen en periferie is inhibitie door lokaal anesthetica van deze receptoren waarschijnlijk relevant. De klinische implicaties moeten verder onderzocht worden.

Om in meer detail het gemeenschappelijke intracellulaire aangrijpingspunt voor lokaal anesthetica binnen de signaalpaden van verschillende G-eiwit gekoppelde receptoren te beschrijven, bepaalden we (gebruikmakend van antisense methodologie) de G-eiwit α subeenheden gekoppeld aan deze receptoren. Als weergegeven in Hoofdstuk 6 toonden we aan dat LPA signalvorming geremd werd door ropivacaine stereoisomeren op concentratie-afhankelijke en stereoselectieve wijze, hetgeen wijst op een eiwit als aangrijpingspunt voor ropivacaine. Deze remming was voornamelijk een resultaat van niet-competitief antagonisme. We vonden ook dat LPA signalvorming voornamelijk wordt gemedieerd door G_{α_q} en G_{α_o} . G_{α_q} koppelt met zowel LPA, muscarinische en trypsine receptoren, en is een belangrijk aangrijpingspunt voor intracellulaire inhibitie van G-eiwit gekoppelde receptoren door lokaal anesthetica. Samenvattend suggereren deze studies dat G-eiwit gekoppelde receptoren een frequent aangrijpingspunt voor lokaal anesthetica zijn. De concentraties gebruikt in dit onderzoek worden routinematig bereikt na lokale injectie van deze middelen. Remming van G-eiwit gekoppelde receptoren door lokaal anesthetica resulteert deels uit een intracellulair effect, hetwelk grotendeels verklaard kan worden door selectieve interactie met G_{α_q} eiwit functie.

Hoofdstuk 7 beschrijft de effecten van lokaal anesthetica op ontsteking, coagulatie en wondgenezing. In dit hoofdstuk wordt een aantal interessante en mogelijk belangrijke "alternatieve" effecten van lokaal anesthetica besproken die niet te verklaren zijn door hun bekende antinociceptieve en antiarrhythmische effecten. De meest opmerkelijke waarneming is dat lokaal anesthetica in staat zijn pathologische veranderingen - zoals hypercoagulabiliteit of excessieve stimulatie van het ontstekingsstelsel - te voorkomen, zonder een bloedingsneiging te induceren of het verdedigingssysteem te onderdrukken. Hierin zijn ze duidelijk anders dan de geneesmiddelen die momenteel in gebruik zijn voor behandeling van dergelijke aandoeningen en dit wijst de richting naar mogelijke therapeutische toepassing. Wijzelf gebruiken intraveneuze lokaal anesthetica in patiënten die gebaat zouden zijn met epiduraal anesthesie/analgesie, maar geen kandidaten zijn voor de techniek. We hopen dat dit hoofdstuk enkele lezers zal aanzetten deze effecten in meer detail te onderzoeken, omdat veel meer onderzoek naar basale mechanismen noodzakelijk is. Wat duidelijk lijkt is dat natriumkanal blokkade slechts een beperkte, of zelfs geen, rol speelt in deze effecten. Verder onderzoek moet aantonen welke moleculaire determinanten van de lokaal anesthetica structuur deze effecten veroorzaken en waar de bijbehorende aangrijpingspunten zijn. Dit zou uiteindelijk kunnen leiden tot de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen, selectief voor de behandeling van deze aandoeningen, maar zonder de "bijwerking" van natriumkanal blokkade.

Hoofdstuk 8 verschaft nieuwe inzichten in het mechanisme van neutrofiel priming, en suggereert daarnaast een mechanisme waardoor lokaal anesthetica sommige van hun anti-inflammatoire effecten teweeg kunnen brengen. We toonden aan dat platelet-activating factor (PAF) neutrofielen primed via een signaalcascade afhankelijk van PTX-ongevoelige G-eiwitten, PLC en PKC. PKC activatie is zowel noodzakelijk als voldoende voor dit proces. Bovendien toonden we aan dat

klinisch relevante concentraties van lokaal anesthetica selectief priming remmen, maar zonder effect zijn op fMLP-geïnduceerde activatie. Ester lokaal anesthetica hadden het meest uitgesproken inhiberende effect en inhiberende potentie van amide lokaal anesthetica werd hoger met de ongeladen fractie. Het belangrijkste aangrijppingspunt voor lokaal anesthetica in de PAF priming signaalcascade is gelokaliseerd boven PKC.

Tenslotte bestudeerden we de preventieve effecten van epiduraalanesthesie op hypercoagulatie in patiënten die grote orthopedische ingrepen ondergingen, zoals beschreven in Hoofdstuk 9. De belangrijkste bevindingen van deze studie waren tweevoudig. In de eerste plaats is de door grote orthopedische chirurgie geïnduceerde hypercoagulabele toestand (die moeilijk aan te tonen is met routine coagulatie testen) betrouwbaar te identificeren met de CSA parameters PHT en CT. De derde parameter, CITF, toonde een neiging tot verkorting; dit was echter niet significant. In de tweede plaats is deze hypercoagulabiliteit volledig te voorkomen in patiënten waarbij epiduraal anesthesie gebruikt wordt. We vonden geen significante verschillen tussen knie- en heupchirurgie. Samenvattend leidt grote orthopedische chirurgie tot een merkbare hypercoagulabiliteit, die betrouwbaar met CSA bepaald kan worden en voorkomen wordt door epiduraalanesthesie.

Verdere onderzoeken zouden gericht moeten zijn op verschillende onderwerpen. In de eerste plaats moet selectieve interactie tussen lokaal anesthetica en $G\alpha_q$ functie bevestigd worden in andere modellen en het werkingsmechanisme moet worden bepaald. In de tweede plaats moet het actieve onderdeel van het lokaalanestheticum molecuul, verantwoordelijk voor deze selectieve interactie met G-eiwit functie, worden geïdentificeerd. Zulke studies maken de ontwikkeling mogelijk van geneesmiddelen gebaseerd op lokaal anesthetica en met de beschreven voordelen, maar zonder de "bijwerking" van natriumkanal blokkade. In de derde plaats moeten de niet-natrium kanaal effecten van lokaal anesthetica *in vivo* in meer detail beschreven worden en hun mogelijke rol in de modulatie van pathofysiologische processen moet worden onderzocht.